



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

I parametri di crescita per migliorare la produzione di composti bioattivi nelle microalghe

16/01/2024

ENEA CR PORTICI

Docente: Dott.ssa Casella Patrizia

Responsabile UO11: Ing. Molino Antonio





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

I parametri che influiscono sulla crescita delle microalghe

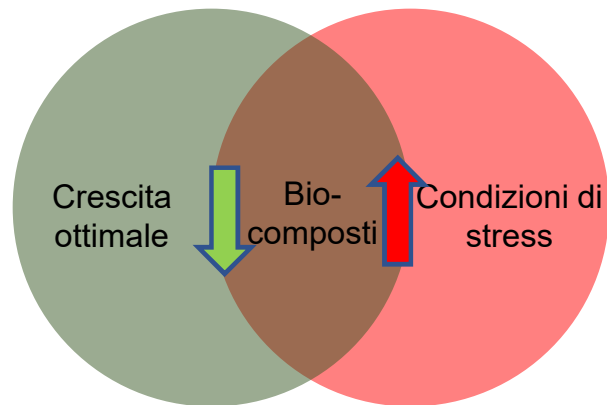
- Temperatura
- Salinità
- Anidride carbonica
- Luce
- Mezzo di crescita
- Nutrienti
- pH

- Autotrofia
- Eterotrofia
- Mixotrofia



I parametri che influiscono sulla crescita delle microalghe

- Temperatura
- Salinità
- Anidride carbonica
- Luce
- Mezzo di crescita
- Nutrienti
- pH



- Autotrofia
- Eterotrofia
- Mixotrofia



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

- Temperatura



Temperatura ottimale per la crescita delle microalghe

- La maggior parte delle specie microalgali cresce ad una temperatura ottimale compresa nell'intervallo tra 15-30 °C
- L'aumento della temperatura oltre i 38 °C diventa una condizione estrema e di stress che porta alla morte delle cellule

Microalga	Temperatura ottimale	Intervallo di temperatura
<i>Chlorella vulgaris</i>	30 °C	15 – 30 °C
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	38.7 °C	5.2 – 45.8 °C
<i>Dunaliella salina</i>	32 °C	0 – 40 °C
<i>Dunaliella tertiolecta</i>	32.6 °C	5 – 38.9 °C
<i>Haematococcus pluvialis</i>	28 °C	20 – 30 °C
<i>Nannochloropsis oceanica</i>	26.7 °C	0.2 – 33.3 °C
<i>Scenedesmus sp.</i>	26.3 °C	-3.1 – 32.7 °C
<i>Porphyridium cruentum</i>	19.1 °C	5.8 – 30 °C

Ras, M., Steyer, J. P., & Bernard, O. (2013). Temperature effect on microalgae: a crucial factor for outdoor production. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 12(2), 153-164.

Ru, I. T. K., Sung, Y. Y., Jusoh, M., Wahid, M. E. A., & Nagappan, T. (2020). *Chlorella vulgaris*: A perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts. *Applied Phycology*, 1(1), 2-11.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto della variazione della temperatura sulla produzione dei carotenoidi

Microalga	Temperatura	Effetto
<i>Haematococcus pluvialis</i>	28 °C	Temperatura ottimale per la crescita della biomassa (1.8 g/L)
	23 °C	La concentrazione della biomassa è inferiore (1.4 g/L) mentre il contenuto di astaxantina non differisce tra 23 °C e 28 °C (3.5 % w/w)
<i>Chlorella sorokiniana FZU60</i>	28 °C	La produzione di biomassa leggermente aumenta tra 28 °C e 33 °C e 38 °C.
	33 °C	
	38 °C	La temperatura di 44 °C diventa critica con una diminuzione della crescita
	44 °C	La produzione di luteina anch'essa aumenta dai 28 ai 33 °C con un incremento maggiore tra i 28 °C ed i 33 °C

Rehman, M., Kesharvani, S., Dwivedi, G., & Suneja, K. G. (2022). Impact of cultivation conditions on microalgae biomass productivity and lipid content. *Materials Today: Proceedings*, 56, 282-290.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

Effetto della variazione della temperatura sui lipidi

Microalga	Temperatura	Effetto
<i>Chlorella vulgaris</i>	25 °C	Incremento della produzione di lipidi quando la temperatura diminuisce da 30 a 25 °C
	35 °C	Decremento del 17% del tasso di crescita
	38° C	Aumento dell'acido oleico (MUFAs)
<i>Nannochloropsis oculata</i>	25 °C	L'aumento della temperatura da 20 a 25 °C aumenta il contenuto di lipidi da 7.9% a 14.9%
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	40 °C	8.33% diminuzione della biomassa; 40% aumento dei lipidi

Rehman, M., Kesharvani, S., Dwivedi, G., & Suneja, K. G. (2022). Impact of cultivation conditions on microalgae biomass productivity and lipid content. *Materials Today: Proceedings*, 56, 282-290.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca

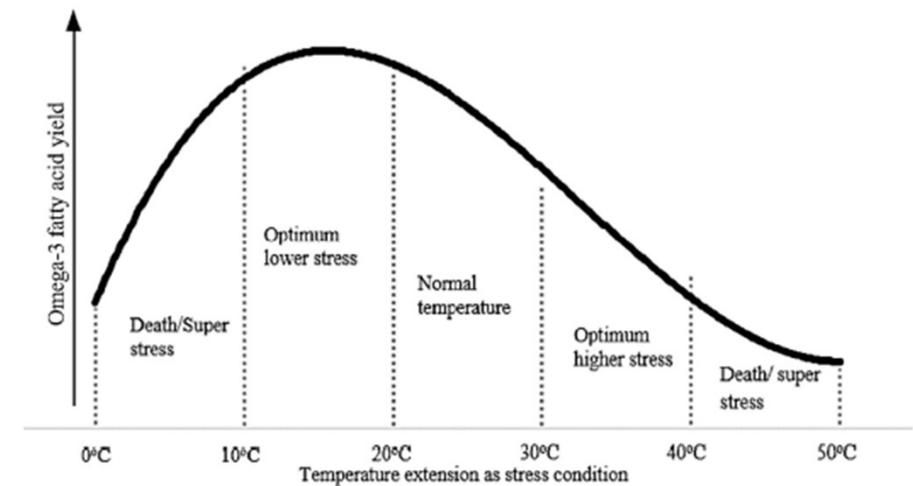


Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto della variazione della temperatura sugli omega-3

Microalga	Temperatura	Effetto
<i>Nannochloropsis</i>	10 °C (insieme a bassa irradianza (30 $\mu\text{mol photons/m}^2/\text{s}$))	Aumento del contenuto di EPA di 3.4 volte
<i>Scenedesmus sp.</i>	20 °C	31% lipidi. L'aumento della temperatura diminuisce gli acidi grassi polinsaturi
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	10°C	Aumento del contenuto di EPA del 85%



Perdana, B. A., Chaidir, Z., Kusnanda, A. J., Dharma, A., Zakaria, I. J., Bayu, A., & Putra, M. Y. (2021). Omega-3 fatty acids of microalgae as a food supplement: A review of exogenous factors for production enhancement. *Algal Research*, 60, 102542.

Rehman, M., Kesharvani, S., Dwivedi, G., & Suneja, K. G. (2022). Impact of cultivation conditions on microalgae biomass productivity and lipid content. *Materials Today: Proceedings*, 56, 282-290.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

- Salinità



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani

PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Il parametro della salinità

Si distinguono tre tipologie di microalghe:

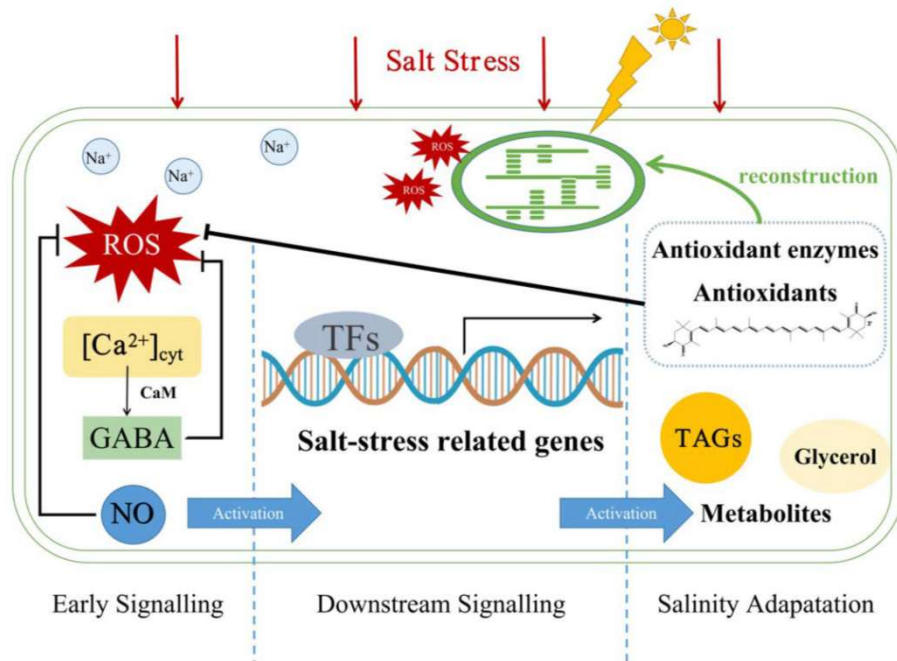
- Marine che tollerano 35 – 55 ppt salinità
- Alotolleranti che tollerano 70 -120 ppt salinità
- Alofiliche che tollerano più di 150 ppt salinità

Microalga	Salinità minima (ppt)	Salinità max (ppt)	Tipologia
<i>Dunaliella salina</i>	35	233	Alofilica
<i>Amphora sp.</i>	35	129	Alotollerante
<i>Navicula sp.</i>	35	129	Alotollerante
<i>Tetraselmis seucica</i>	35	109	Marina
<i>Tisochrysis lutea</i>	35	75	
<i>Phaedactylum tricornutum</i>	35	65	
<i>Nannochloropsis sp.</i>	35	55	
<i>Chaetoceros muelleri</i>	35	55	

Ishika, T., Bahri, P. A., Laird, D. W., & Moheimani, N. R. (2018). The effect of gradual increase in salinity on the biomass productivity and biochemical composition of several marine, halotolerant, and halophilic microalgae. *Journal of applied phycology*, 30, 1453-1464.



Meccanismi di risposta delle microalghe allo stress salino



- Lo stress salino innesca i primi segnali attraverso l'aumento dello ione Ca^{2+} nel citosol che ha la funzione di messaggero secondario universale;
- Aumenta anche la presenza di specie ROS (messaggeri secondari) a causa dello stato di stress alla cellula;
- La cellula per compensare lo stress salino ed eliminare le specie ROS produce enzimi antiossidanti (catalasi e superossido desmutasi) e composti antiossidanti come i **carotenoidi**;
- Per mantenere l'osmoregolazione la cellula mantiene le concentrazioni interne di sodio e potassio regola la produzione di glicerolo;
- Un'altra risposta alle condizioni di stress salino è produzione di molecole chiave per la riserva cellulare di lipidi (TAG).



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetti della salinità sulla produzione di carotenoidi e lipidi

Microalga	Salinità	Effetto
<i>Haematococcus pluvialis</i>	2 g/L NaCl + maggiore esposizione solare (250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	2,2 volte maggiore il contenuto di astaxantina rispetto al controllo
<i>Chlorella sorokiniana</i>	NaCl (20%)	1,25 volte maggiore il contenuto di astaxantina
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	160 mM NaCl	18,3% lipidi (14 % nel controllo senza NaCl)
<i>Scenedesmus dimorphus</i>	160 mM NaCl	31 % lipidi (26% nel controllo senza NaCl)
<i>Chlorella sp.</i>	160 mM NaCl	32 % lipidi (27% nel controllo senza NaCl)

Ren, Y., Sun, H., Deng, J., Huang, J., & Chen, F. (2021). Carotenoid production from microalgae: biosynthesis, salinity responses and novel biotechnologies. *Marine Drugs*, 19(12), 713.

Gour, Rakesh Singh, Vijay Kumar Garlapati, and Anil Kant. "Effect of salinity stress on lipid accumulation in *Scenedesmus sp.* and *Chlorella sp.*: feasibility of stepwise culturing." *Current Microbiology* 77 (2020): 779-785.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



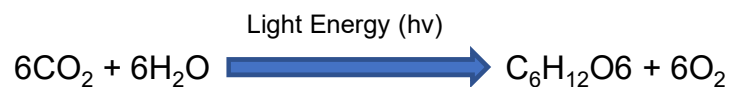
Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

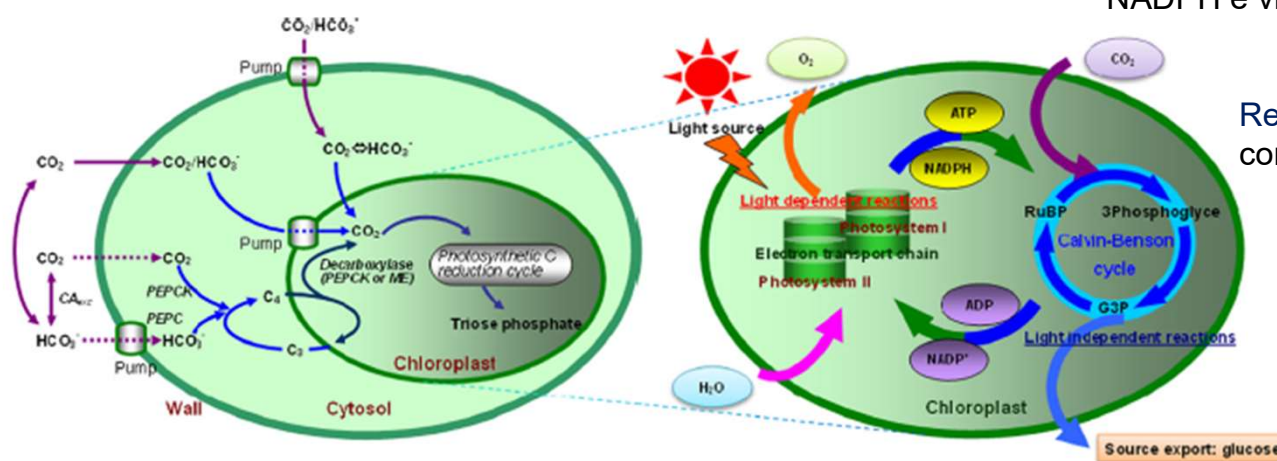
- Anidride carbonica



Il processo fotosintetico



Reazione dipendente dalla luce: la luce viene catturata da clorofille e carotenoidi, la sua energia viene convertita e trasportata da ATP e NADPH e viene liberato ossigeno



Reazione indipendente dalla luce: Ciclo di Calvin-Benson con la produzione di glucosio



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca

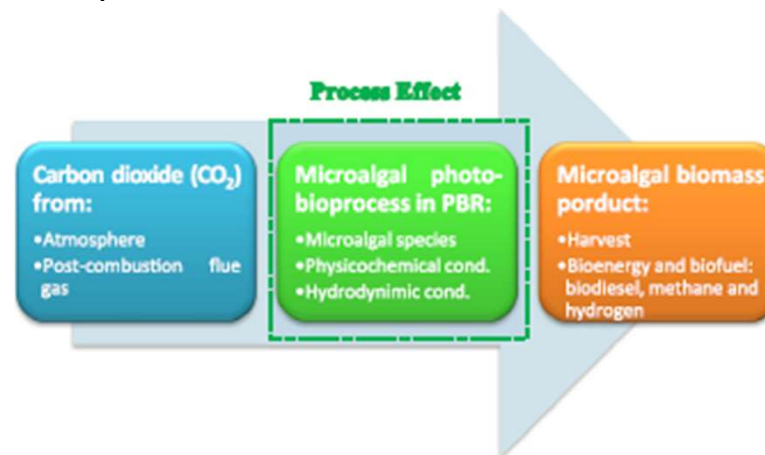


Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetti dovuti alla concentrazione di CO₂

- La concentrazione della CO₂ in atmosfera è circa 0,04% v/v
- La crescita della maggior parte delle microalghe può essere negativamente influenzata da concentrazioni di CO₂ > 1% v/v
- Nonostante ciò le microalghe possono essere considerate al pari delle tecnologie di cattura della CO₂ con il vantaggio di poter sfruttare questa loro capacità per produrre bioprodotto





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani

PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Concentrazione della CO₂ tollerata dalla microalghe

Microalga	Concentrazione CO ₂ (% v/v)	Altri parametri
<i>Nannochloropsis sp.</i>	15 %	Intensità luminosa 168 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH 6,3 Temperatura 25 °C Coltura Batch 1 litro
<i>Chlorella sp.</i>	10-70%	Intensità luminosa 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH 6,3 – 3,5 Temperatura 25 °C Coltura Batch 0,2 litro Bubble column
<i>Chlorella vulgaris</i>	0,04 - 30	Intensità luminosa 58,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH 6,3 Temperatura 25 °C Coltura Batch 0,1 litro Flask



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Concentrazione della CO₂ tollerata dalla microalghe

Microalga	Concentrazione CO ₂ (% v/v)	Lipidi (produttività) (mg/L giorno)
<i>Scenedesmus sp.</i>	10	Intensità luminosa 44,8 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH 7,4-5,3 Temperatura 30 °C Coltura Flask 1,8 litro
<i>Scenedesmus almeriensis</i>	3	Intensità luminosa 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ pH 6 - 8 Temperatura 28 °C Coltura Batch 1,2 e 28 litro Bubble column



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



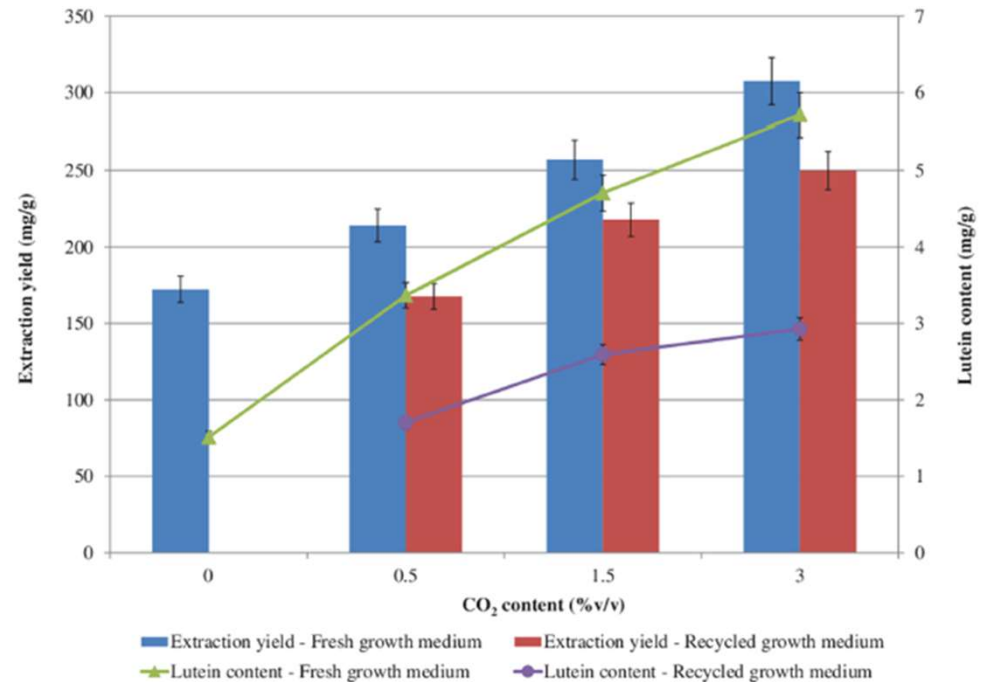
Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetti dovuti alla concentrazione di CO₂ sulla produzione di bioprodotto

Caso studio della microalga *Scenedesmus almeriensis*

- Il cui contenuto di luteina aumenta all'aumentare della concentrazione di CO₂
- La resa di estrazione più alta (307,44 mg/g) e il contenuto di luteina più elevato (5,71 mg/g) sono stati ottenuti con un contenuto di CO₂ del 3,0%v/v nel terreno di crescita fresco.





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani

PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetti dovuti alla concentrazione di CO₂ sulla produzione di bioprodotto

Microalga	Concentrazione CO ₂ (% v/v)	Contenuto carotenoidi (mg/g cellule)	Produttività dei lipidi (mg/L/giorno)
<i>Scenedesmus sp.</i>	10 (0,5 vvm)	7,7	61
<i>Scenedesmus sp.</i>	20 (0,5 vvm)	20,5	26
<i>Nannochloropsis sp.</i>	10 (0,5 vvm)	9,2	69
<i>Nannochloropsis sp.</i>	20 (0,5 vvm)	44,6	46
<i>Chlorella sp.</i> (marina)	10 (0,5 vvm)	23	61
<i>Chlorella sp.</i> (marina)	20 (0,5 vvm)	47	15
<i>Chlorella sp.</i> (acqua dolce)	10 (0,5 vvm)	12	55
<i>Chlorella sp.</i> (acqua dolce)	20 (0,5 vvm)	35	24

Thawechai, Tipawan, et al. "Mitigation of carbon dioxide by oleaginous microalgae for lipids and pigments production: Effect of light illumination and carbon dioxide feeding strategies." *Bioresource Technology* 219 (2016): 139-149.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



L'utilizzo della CO₂ proveniente da gas di combustione

- La potenzialità di utilizzare le microalghe come tecnologia di sequestro della CO₂ potrebbe essere sfruttata per utilizzare l'anidride carbonica dei gas di combustione.
- Il punto di debolezza nell'utilizzo dei gas di combustione per la crescita delle microalghe è dovuto alla presenza di sostanze inquinanti altamente tossiche per le microalghe, principalmente NO_x ed SO_x
- La concentrazione di SO₂ maggiore di 100 ppm è letale per la crescita delle microalghe
- Nei gas di combustione gli NO_x sono costituiti dal 90-95% di NO e dal 5-10% di NO₂ con concentrazioni da 100 a 1000 ppm.

Microalga	CO ₂ %/SO ₂ (ppm)/NO(ppm)	Tasso di produzione della biomassa (g/L/giorno)	Tasso di fissazione CO ₂ (g/L/giorno)
Chlorella sp.	15/0/0	1,4	2,63
	15/60/0	0,89	1,67
	15/100/0	0,55	1,04
	15/150/0	NA	NA
Nannochloropsis sp.	15/0/0	0,26	0,48
	15/50/0	0,24	0,46
	15/0/300	0,08	0,15

Zhao, B., & Su, Y. (2014). Process effect of microalgal-carbon dioxide fixation and biomass production: a review. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 31, 121-132.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

- Luce



Finanziato dall'Unione europea
NextGenerationEU



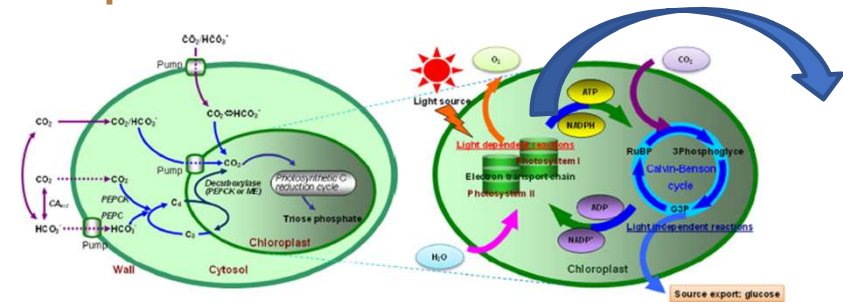
Ministero dell'Università e della Ricerca



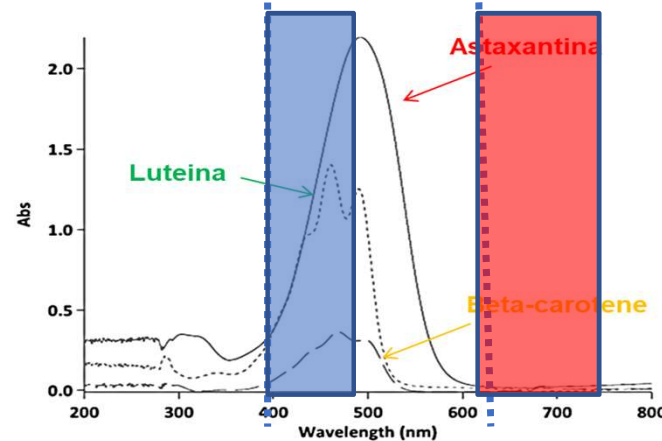
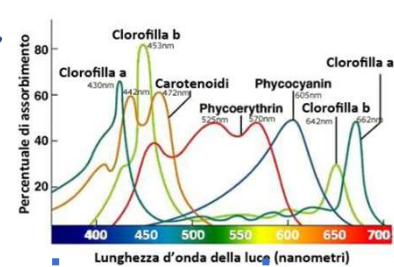
Italiadomani
PIANO NAZIONALE DI RIPRESA E RESILIENZA



Il processo fotosintetico



I pigmenti fotosintetici



Concentrazione carotenoidi 10 mg/L in DMSO

Colore	Lunghezza d'onda (nm)	Frequenza (THz)
Violetto	380-450	670-790
Blu	450-485	620-670
Ciano	485-500	600-620
Verde	500-565	530-600
Giallo	565-590	510-530
Arancione	590-625	480-510
Rosso	625-750	400-480

Pigments	Absorption Maxima in Organic Solvents, nm	Representatives
chlorophyll a	420, 660	All algae
chlorophyll b	435, 643	Green algae
chlorophyll c	445, 625	Heterokontophyta, Haptophyta, Dinophyta, Cryptophyta
chlorophyll d	450, 690	Rhodophyta, some Cyanobacteria
chlorophyll f	707	Some Cyanobacteria
β-carotene	425, 450, 480	Most algae
α-carotene	420, 440, 470	Some algae (Cryptophyta, Haptophyta, Dinophyta, Chrysophyceae), some Cyanobacteria
fucoxanthin	425, 450, 475	Heterokontophyta (Bacillariophyceae Phaeophyceae, Chrysophyceae), Haptophyta
phycoerythrin	490, 546, 576	Rhodophyta, Cryptophyta, Cyanobacteria
phycocyanin	618	Rhodophyta, Cryptophyta, Cyanobacteria
allophycocyanin	650	Rhodophyta, Cryptophyta, Cyanobacteria

Green algae: *Chlamydomonas*, *Scenedesmus*, *Haematococcus*

Cryptophyta: *Cryptomonas*, *Rhodomonas*

Cyanobacteria: *Spirulina*



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Intensità luminosa ottimale

Microalga	Intensità luminose testate ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Intensità ottimale ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)
<i>Nannochloropsis salina</i>	5, 25, 50, 100, 250, 280	26-55
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	60, 100, 250, 500, 750	60-112
<i>Chlorella vulgaris</i>	50, 150, 300	150
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50, 150, 300	150
<i>Isochrysis galbana</i>	50, 125, 325	325
<i>Dunaliella salina</i>	200, 500, 1000, 1500	1000/1500

Maltsev, Y., Maltseva, K., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2021). Influence of light conditions on microalgae growth and content of lipids, carotenoids, and fatty acid composition. *Biology*, 10(10), 1060.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto della luce sulla produzione del betacarotene

Microalga	Condizioni di crescita	Ciclo luce/buio	Intensità massima ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Biomassa g/L (su secco)	Beta-carotene (% su peso secco)	Resa betacarotene (mg/l)
Dunaliella salina	PBR a pannello 25 °C	14/10 (6:00 alle 20:00)	600	0,5	2 (6 giorni)	10
	Illuminazione LED Giorni coltivazione 6	14/10	1320	1.2	6,5 (5 giorni)	58
		14/10	1000	1,0	4,5 (5 giorni)	35
		14/10	2000	1,3	8,0 (5 giorni)	70
		24	336	0,9	3,7 (3 giorni)	30
		24	770	1,3	6,5 (3 giorni)	60

Xi, Y., Wang, J., Chu, Y., Chi, Z., & Xue, S. (2020). Effects of different light regimes on *Dunaliella salina* growth and β -carotene accumulation. *Algal Research*, 52, 102111.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto della qualità ed intensità sulla produzione di astaxantina

Microalga	Condizioni di crescita	Rapporto % luce rossa:blu	Biomassa g/L (su secco)	Astaxantina (mg/g)	Produttività (mg/l/giorno)
<i>Haematococcus pluvialis</i>	PBR cilindrico 1 L 21 °C CO ₂ 10% Intensità luminosa 100 µmol/fotone/m ² /s FASE VERDE 300 µmol/fotone/m ² /s FASE ROSSA Illuminazione LED luce blu (450 nm) LED luce rossa (660 nm) Giorni coltivazione 7	100% rossa	0,35 fase verde > 2 g/l fase rossa	21,5	5
		75/25	0,27 fase verde 1,75 g/l fase rossa	27	9
		50/50	0,27 fase verde 1,75 g/l fase rossa	27	9
		25/75	0,27 fase verde 1,75 g/l fase rossa	27	9
		100% blu	0,22 fase verde 2 g/l fase rossa	25	7,5

Pereira, S., & Otero, A. (2020). *Haematococcus pluvialis* bioprocess optimization: Effect of light quality, temperature and irradiance on growth, pigment content and photosynthetic response. *Algal Research*, 51, 102027.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani

PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto dell'intensità e della frequenza sulla produzione di lipidi

Microalga	Intensità luminosa ($\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$)	Biomassa g/L (su secco)	Lipidi (% su peso secco)
<i>Chlorella sp.</i>	40	2,2	23
	200	3	29
	400	2,5	33

Microalga	Frequenza	Lipidi (% su peso secco)
<i>Chlorella sp.</i>	Rossa	13,1
	Gialla	12,7
	Verde	7,2



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

- Il mezzo di crescita



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Mezzi di crescita

Compositions	Basal medium (g/l)	Modified Bristol's medium (CZ-M1) (g/l)	MBL medium (g/l)	Chemical component	CZ-M1	SE	BG-11	BBM
Medium type	Nitrogen rich Nutrient rich	Nitrogen rich Nutrient poor	Nitrogen poor Nutrient poor	NaNO ₃	750 mg	250 mg	1.5 g	250 mg
NaCl		0.025		MgSO ₄ ·7H ₂ O	75 mg	75 mg	75 mg	75 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1106	0.025	0.0368	CaCl ₂ ·H ₂ O	25 mg	25 mg	36 mg	25 mg
NaNO ₃		0.75	0.085	NaCl	25 mg	25 mg	–	25 mg
KNO ₃	1.25			K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	75 mg	75 mg	40 mg	–
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	0.075	0.037	KH ₂ PO ₄	175 mg	175 mg	–	175 mg
NaHCO ₃			0.0126	Na ₂ EDTA	–	0.2 mg	1 mg	0.75 mg
K ₂ HPO ₄		0.075	0.0087	FeCl ₃ ·6H ₂ O	5 mg	0.5 mg	–	9.7 µg
KH ₂ PO ₄	1.25	0.175		MnSO ₄ ·H ₂ O	0.17 mg	–	–	–
Na ₂ O ₃ Si·9H ₂ O			0.0284	FeSO ₄ ·7H ₂ O	69.5 µg	–	–	–
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.0498			(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	12.35 µg	–	–	–
FeCl ₃ ·6H ₂ O		0.005	0.00315	H ₃ BO ₃	61 µg	2.86 mg	2.86 mg	–
EDTA·2Na	0.5		0.00436	CuSO ₄ ·5H ₂ O	2.5 µg	80 µg	79 µg	–
H ₃ BO ₃	0.1142	0.000061	0.001	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287 µg	0.22 mg	222 µg	5 µg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.0144		0.00018	MnCl ₂ ·4H ₂ O	–	1.86 mg	1.81 mg	41 µg
MnSO ₄ ·7H ₂ O		0.000169		Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	–	50 µg	49 µg	2 µg
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.0882	0.000287	0.000022	Na ₂ MoO ₄	–	0.39 mg	0.39 mg	4 µg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.0119		0.000006	Na ₂ CO ₃	–	–	20 mg	–
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·7H ₂ O		0.00000124		Citric acid	–	–	6 mg	–
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0157	0.0000025	0.00001	Ferric ammonium citrate	–	–	6 mg	–
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.0049			Vitamin B ₁	–	–	–	1 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O			0.00001	Biotin	–	–	–	0.25 µg
				Vitamin B ₁₂	–	–	–	0.15 µg
				Total volume	1 L	1 L	1 L	1 L

Tutti i mezzi di coltivazione contengono:

- Fonte di nitrato (NaNO₃)
- Altri macronutrienti come fosfato di potassio (mono e dibasico), solfato (solfato di magnesio, solfato di rame, solfato di zinco), cloruro di calcio, carbonato di calcio
- Micronutrienti: sodio molibdato, acido borico,
- Vitamine (B12, biotina)



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto del mezzo di crescita

Microalga	Mezzo di crescita			
H. pluvialis	BG-11	BBM	SE	CZ-M1
Concentrazione biomassa	0.5 g/l	0.4 g/l	0.4 g/l	0.8 g/l
Concentrazione (astaxantina)	12 mg/l	8 mg/l	8 mg/l	6 mg/l

La maggiore concentrazione di astaxantina è stata ottenuta utilizzando il BG11

Zhao, Y., Yue, C., Geng, S., Ning, D., Ma, T., & Yu, X. (2019). Role of media composition in biomass and astaxanthin production of *Haematococcus pluvialis* under two-stage cultivation. *Bioprocess and biosystems engineering*, 42, 593-602.

Microalga	Mezzo di crescita		
<i>S. almeriensis</i>	Bioprocess	Mann & Myers'	Hemmerick
Produttività biomassa g/l/ giorno	0.55 g/l	0.5 g/l	0.25 g/l

Sánchez, J. F., Fernández, J. M., Ación, F. G., Rueda, A., Pérez-Parra, J., & Molina, E. (2008). Influence of culture conditions on the productivity and lutein content of the new strain *Scenedesmus almeriensis*. *Process Biochemistry*, 43(4), 398-405.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani

PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto del mezzo di crescita

Microalga	Mezzo di crescita		
<i>Dunaliella salina</i>	Conway	F/2	Johnson
Concentrazione biomassa	0.25 g/l	0.19 g/l	0.16 g/l
Proteine (% su peso secco)	23.4	19	38.3
Lipidi (% peso secco)	31	43	29
Carboidrati (% su peso secco)	5.6	6.9	11.3
Concentrazione (carotenoidi)	2.5 µg/l	1.5 µg/l	1.5 µg/l

La coltivazione di cellule di *D. salina* con i terreni F/2, Conway e Johnson ha mostrato differenze nella crescita e nelle caratteristiche biochimiche.

Il contenuto di proteine (38,3%) e di carboidrati totali (11,3%) è stato notevolmente migliorato con il mezzo di crescita Johnson.

una maggiore produzione di lipidi (43,4%) è stata ottenuta usando il mezzo Conway

Il terreno di coltura Conway ha mostrato una produzione di luteina pari a 2,60 mg/g ed ha consentito una crescita più rapida delle cellule.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto trofico sulla produttività dei lipidi

Condizioni di coltivazione	Fonte di energia	Fonte di carbonio
Fototrofiche	Luce	Inorganico (CO ₂ , NaHCO ₃)
Eterotrofiche	Organico	Glucosio
Fotoeterotrofiche	Luce	Glucosio
Mixotrofiche	Luce e carbonio organico	CO ₂ e glucosio

Microalga	Condizione trofica	Biomassa produttività g/L/giorno	Lipidi produttività g/L/giorno
<i>A. platensis</i>	Fotoautotrofico	0,86	0,33
	Eterotrofico	4,3	2,7
	Mixotrofico	7,2	5,6
<i>Nannochloropsis sp.</i>	Fotoautotrofico	0,7	0,2
	Eterotrofico	2,2	1,4
	Mixotrofico	6,0	3,5

Verma, R., Kumari, K. K., Srivastava, A., & Kumar, A. (2020). Photoautotrophic, mixotrophic, and heterotrophic culture media optimization for enhanced microalgae production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 8(5), 104149.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

- Effetto dei nutrienti



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

I principali nutrienti per la produzione della biomassa microalgale

- Azoto
- Fosforo



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Azoto e fosforo

- L'azoto (N) è un elemento essenziale per tutte le microalghe, essendo un componente delle macromolecole cellulari più abbondanti come proteine ed acidi nucleici.
- Può essere fornito sotto forma di nitrati, nitriti, ione ammonio ed organici come l'urea.
- Non tutte le microalghe sono in grado di utilizzare ogni forma di N
- La fonte di N più utilizzata per le colture microalgali è il nitrato con un uso più limitato del nitrito che può essere tossico ad alte concentrazioni
- Il fosforo (P) è un macronutriente essenziale per la crescita normale di tutte le alghe in quanto è un componente di importanza cruciale per la biosintesi degli acidi nucleici e dei fosfolipidi, per la modifica della funzione delle proteine e per il trasferimento di energia
- La biomassa algale contiene solitamente meno dell'1% di P.
- La forma principale in cui le alghe acquisiscono il P è il fosfato inorganico sotto forma di $H_2PO_4^-$ o HPO_4^{2-} . Il trasporto di PO_4^{3-} nella cellula microalgale è un processo che richiede energia. In condizioni di ricchezza di fosforo le microalghe formano grandi granuli di polifosfato che servono come deposito interno di P e vengono metabolizzati in condizioni di P-deprivazione.

Descrizione Azoto (NO_3 o NH_4^+)	N g/L
Azoto contenuto completo	> 0.4
Moderato contenuto di azoto	0.4 – 0.2
Moderata limitazione	0.2 – 0.1
Forte limitazione di azoto	< 0.1
Senza azoto	0

Descrizione fosforo (PO_4^-)	P g/L
P contenuto completo	> 0.2
Moderato contenuto P	0.2 – 0.02
Moderata limitazione	0.02 – 0.01
Forte limitazione di P	< 0.01
Senza P	0

Maltsev, Y., Kulikovskiy, M., & Maltseva, S. (2023). Nitrogen and phosphorus stress as a tool to induce lipid production in microalgae. *Microbial Cell Factories*, 22(1), 239.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto della privazione di azoto sulla produzione di carotenoidi

Microalga	Condizioni di crescita	Fonte di azoto	Concentrazione biomassa	Carotenoide	Lipidi	Altri composti
Haematococcus pluvialis ¹	Flask 26 °C 300 µmol fotone/m ² /s Giorni di crescita: 40	NaNO ₃ 0.9 g/l CaCO ₃ 0.05 mg/l	Presenza azoto: 2 g/l Assenza azoto: 0.25 g/L	Astaxantina Presenza azoto (A): 0.6 µg/cellula Assenza azoto (N-A): 1.5 µg/cellula	Presenza azoto: 24 µg/cellula Assenza azoto: 24 µg/cellula	Proteine A: 7 µg/cellula N-A: 3 µg/cellula Carboidrati A: 5 µg/cellula N-A: 4 µg/cellula
Dunaliella salina ²	Flask 25 °C 60 µmol fotone/m ² /s Giorni di crescita: 22	Azoto 1 g/l	Presenza azoto: 0.85 g/l Assenza azoto: 0.55 g/L	Beta-carotene Presenza azoto (A): 7 mg/g Assenza azoto (N-A): 14 mg/g	Presenza azoto: 24 % Assenza azoto: 39%	Proteine A: 45% N-A: 21% Carboidrati A: 20% N-A: 31%

1) Zarei, Z., & Zamani, H. (2023). Biorefinery potential of Microalga Haematococcus pluvialis to produce astaxanthin and Biodiesel under Nitrogen Deprivation. *BioEnergy Research*, 16(3), 1777-1788.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto della privazione di azoto sulla produzione dei lipidi

Microalga	Fonte di azoto	Contenuto di lipidi (azoto sufficiente)	Contenuto di lipidi (assenza di azoto)
<i>Nannochloropsis sp.</i>	KNO ₃ 0.45 g/l	29%	56%
<i>Scenedesmus obliquus</i>	KNO ₃ 0.1%	21%	46%
<i>Chlorella vulgaris</i>	KNO ₃ 0.1%	23%	58%
<i>Botryococcus braunii</i>	KNO ₃	39%	61%



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto della privazione di azoto sulla produzione EPA e DHA

Microalga	Condizioni di coltivazione	Fonte di azoto	Concentrazione biomassa	lipidi	Altri composti
<i>Nannochloropsis oceanica</i> ¹	Bubble column 1L 25°C 2% CO ₂ v/v Illuminazione continua 700 µmol/m ² /s	KNO ₃ 1.5 g/l	Presenza azoto: 5.5 g/l Assenza azoto: 6 g/l	Presenza azoto: 22.5 % TFA Assenza azoto: 32.5 % TFA	EPA Presenza azoto: 17 % su totale acidi grassi Assenza azoto: 8% su totale acidi grassi
<i>Isochrysis sp.</i> ²	Flask 20°C NO CO ₂ Illuminazione 16:8 h 18.85 µmol/m ² /s	NaNO ₃ 100g/L NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 20 g/L	Presenza azoto: 220 mg/l Assenza azoto: 100 g/l	Presenza azoto: 40 % Assenza azoto: 65 %	EPA Presenza azoto: 16.34 mg/g biomassa Assenza azoto: 18.41 mg/g DHA Presenza azoto: 0.28 mg/g Assenza azoto: 0.40 mg/g

- Solovchenko, A., Lukyanov, A., Solovchenko, O., Didi-Cohen, S., Boussiba, S., & Khozin-Goldberg, I. (2014). Interactive effects of salinity, high light, and nitrogen starvation on fatty acid and carotenoid profiles in *Nannochloropsis oceanica* CICALA 804. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116(5), 635-644.
- Jeyakumar, B., Asha, D., Varalakshmi, P., & Kathiresan, S. (2020). Nitrogen repletion favors cellular metabolism and improves eicosapentaenoic acid production in the marine microalga *Isochrysis sp.* CASA CC 101. *Algal Research*, 47, 101877.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto della privazione di fosforo

Microalga	Condizioni di coltivazione	Fonte di fosforo	carotenoidi
<i>Chlorella vulgaris</i>	1L 25°C 2% CO ₂ v/v Illuminazione 12:12 125 µmol/m ² /s	0,05 mM	Presenza P 3,8 mg/g Assenza P: 0,9 mg/g
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>			Presenza P 7,8 mg/g Assenza P: 2,7 mg/g
<i>Tetraselmis suecica</i>			Presenza P 2,5mg/g Assenza P: 1,3 mg/g

Goiris, K., Van Colen, W., Wilches, I., León-Tamariz, F., De Cooman, L., & Muylaert, K. (2015). Impact of nutrient stress on antioxidant production in three species of microalgae. *Algal Research*, 7, 51-57.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA



Effetto della privazione di fosforo

Microalga	Condizioni di coltivazione	Fonte di fosforo	carotenoidi	Lipidi
<i>Tetraselmis marina</i>	15 L 26°C 60 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$	Controllo N (0.88 mM), P (0.42 mM)	Controllo 40.3 mg/g Assenza P: 65mg/g	Controllo 20% Assenza P: 40%

Moussa, I. D. B., Chtourou, H., Karray, F., Sayadi, S., & Dhoub, A. (2017). Nitrogen or phosphorus repletion strategies for enhancing lipid or carotenoid production from *Tetraselmis marina*. *Bioresource technology*, 238, 325-332.



Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



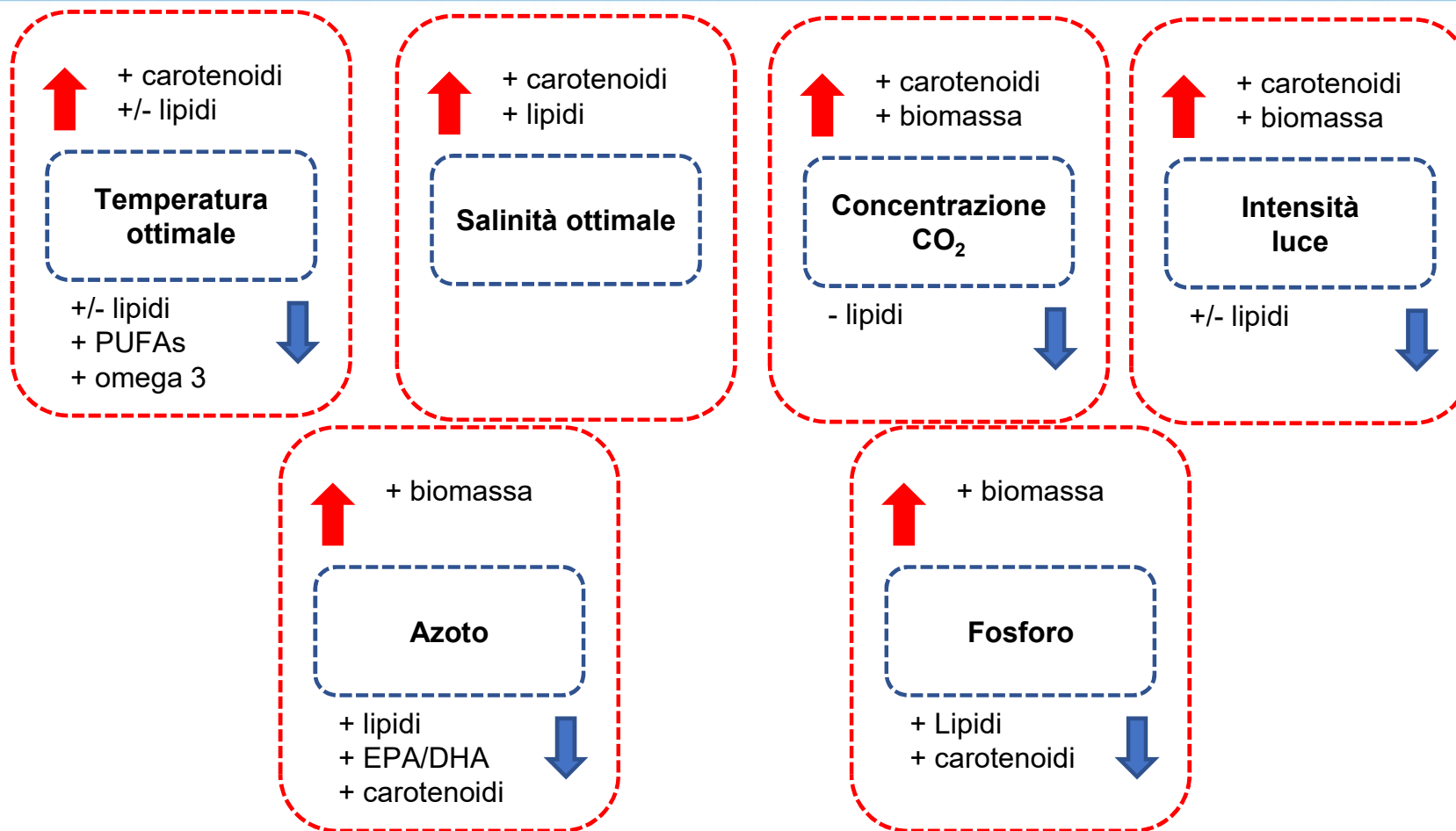
Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani

PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT





Finanziato
dall'Unione europea
NextGenerationEU



Ministero
dell'Università
e della Ricerca



Italiadomani
PIANO NAZIONALE
DI RIPRESA E RESILIENZA

SUS-MIRRI.IT

Grazie per l'attenzione

Organizzatore e Responsabile dell'unità operativa UO11: Ing. Antonio Molino

Responsabile del laboratorio PROBIO: Dott. Roberto Balducci

Coordinatore delle attività Responsabile ENEA per il progetto PNRR SUS-MIRRI.IT: Dott.ssa Annamaria Bevivino

Docente e curatore della collezione della UO11: Dott.ssa Patrizia Casella